Iranian Journal of Pulses Research
Homepage: https://ijpr.um.ac.ir
Vol. 12, No. 2, December 2021, p. 136-150
Original Research; DOI: 10.22067/ijpr.v12i2.87109

پژوهش‌های حبوبات ایران
سال(دوره) ۱۲ شمارهٔ ۲، نیمهٔ دوّم ۱۴۰۰
صفحهٔ ۱۵۰-۱۳۶، نوع مقاله: پژوهشی

اثر اسید سالیسیلیک و کودهای زیستی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و عملکرد ارقام نخود دیم (*Cicer arietinum* L.)

فردین مؤمنی[۱]، علیرضا ابدالی مشهدی[۲*]، سید عطاله سیادت[۳]، بابک پاکدامن سردرود[۴] و مختار قبادی[۵]

۱- دانشجوی دکتری، زراعت، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان؛ f_moemeni@yahoo.com
۲- دانشیار زراعت، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
۳- استاد زراعت، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران؛ seyedatasiadat@yahoo.com
۴- استادیار گیاهپزشکی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، اهواز، ایران؛ bpakdaman@asnrukh.ac.ir
۵- دانشیار زراعت، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران؛ ghobadi.m@razi.ac.ir

تاریخ‌ها:
دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰، بازنگری: ۱۳۹۹/۰۷/۰۵، پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۶؛ انتشار آنلاین مقاله: ۱۴۰۰/۱۰/۰۱

نحوه ارجاع به مقاله:
مؤمنی، ف.، ابدالی مشهدی، ع.، سیادت، س.ع.، پاکدامن سردرود، ب.، و قبادی، م. ۱۴۰۰. اثر اسید سالیسیلیک و کودهای زیستی بر برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و عملکرد ارقام نخود دیم (*Cicer arietinum* L.). پژوهش‌های حبوبات ایران ۱۲(۲): ۱۳۶-۱۵۰.

چکیده

بهبود وضعیت فیزیولوژیک گیاه در شرایط دیم می‌تواند باعث افزایش توان گیاه و بالابردن تولید در گیاه گردد. در همین راستا آزمایشی به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ در کرمانشاه در شرایط دیم اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل دو رقم بیونیج (رقم محلی) و آزاد (رقم اصلاح‌شده)، سه سطح محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک (عدم کاربرد، مصرف نیم و یک میلی‌مولار) که حدود دو هفته قبل ازگل‌دهی آغاز و به مدت ۲۰ روز ادامه یافت و کودهای‌زیستی در پنج سطح (شاهد، باکتری بیوسوپرفسفات (Pseudomonas+Enterobacter)، باکتری بیوسولفور (*Thiobacillus* spp.)، باکتری ریزوبیوم (*Mesorhizobium ciceri*) و قارچ میکوریز (*Rhizophagus irregularis*) همزمان با کاشت اعمال گردید. صفات مورد بررسی شامل محتوای‌نسبی آب برگ، آب نسبی ازدست‌رفته برگ‌ها (RWL[۲])، کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل، نسبت کلروفیلa/b، کاروتنوئید، پراکسید هیدروژن، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و عملکرد دانه بود. محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و کاربرد کودهای‌زیستی تولید پراکسید هیدروژن را افزایش و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را کاهش داد. بالاترین فعالیت کاتالاز در رقم بیونیج×عدم محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک، رقم بیونیج×عدم کاربرد کودزیستی و عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک×کودزیستی و کمترین فعالیت کاتالاز در رقم آزاد×اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار، رقم بیونیج×بیوسوپرفسفات و اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار×بیوسولفور به‌دست آمد. بالاترین و کمترین فعالیت پراکسیداز به‌ترتیب در شرایط عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک×عدم کاربرد کودزیستی (۰/۰۷۸ نانومول بر دقیقه بر گرم) و اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار×کاربرد ریزوبیوم (۰/۰۴۹ نانومول بر دقیقه بر گرم) حاصل شد. محتوای کلروفیلa، کلروفیلa/b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با کاربرد کودهای‌زیستی به‌ترتیب تا ۱/۸۳، ۱/۲۶۹، ۳/۳۴۷ و ۹/۶۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر افزایش یافت. بیشترین عملکرد دانه به میزان ۱۶۲۶ کیلوگرم در هکتار در تیمار کاربرد ریزوبیوم و در سطح نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک به‌دست آمد. با توجه به نتایج این پژوهش محلول‌پاشی نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک همراه با کاربرد کودهای‌زیستی دارای باکتری ریزوبیومی و قارچ میکوریز علاوه بر بهبود ویژگی فیزیولوژیکی، منجر به افزایش ۳۴ درصدی عملکرد دانه در مقایسه با شاهد گردید که به لحاظ اقتصادی بسیار قابل توجه بود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدانت؛ پراکسیدهیدروژن؛ کاتالاز، کاروتنوئیدها؛ کلروفیل

* **نویسنده مسئول:** alirezaabdali@ramin.ac.ir

۲- Relative Water Loss

مقدمه

برای حصول عملکرد بیشتر حبوبات در شرایط دیم نیاز به بهینه‌نمودن استفاده از سایر منابع می‌باشد. نخود زراعی (*Cicer arietinum* L.) یکی از حبوبات باارزش و همچنین منبع سرشار و ارزان پروتئین در قاره آسیا است که می‌تواند به بهبود کیفیت خوراک کمک نماید (Jesfar *et al*., 2018). فراهمی عناصر غذایی با استفاده از کودها نقش پایه‌ای در افزایش عملکرد دارد. کودهای‌زیستی دارای پتانسیل بالا برای جایگزینی کودهای شیمیایی به منظور تغذیه گیاهان هستند. کودهای‌زیستی سلول‌های فعال بیولوژیک یا سویه‌های سلول های در حال کمون هستند که از طریق تلقیح‌کردن باعث می‌شوند تثبیت و جذب مواد مغذی بهبود یابد. این کودها با محیط سازگار بوده و اثر مثبت زیادی بر عملکرد محصولات زراعی دارند (Dahal & Bhandari, 2019). کودهای‌زیستی در بالابردن فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت نقش دارند (Beres *et al*., 2012).

بیشتر محصول نخود در ایران از زراعت دیم به‌دست می‌آید و در بسیاری از موارد این دیم‌زارها با تنش خشکی مواجه هستند. تحمل به خشکی در گیاهان ممکن است با شیوه های مختلف مانند فناوری‌های به‌نژادی و استفاده از تنظیم کننده‌های رشد بهبود یابد. اسیدسالیسیلیک از ترکیبات شیمیایی است که برای کاهش اثرات خطرناک تنش خشکی بر روی گیاهان استفاده می شود (Elhakem, 2019). در شرایط تنش غیرزیستی، اسیدسالیسیلیک از طریق تنظیم اسمولیت‌ها، افزایش سنتز پرولین، افزایش غلظت گلایسین، بتایین، افزایش پلی‌آمین‌ها و اسیدهای آمینه و نیز اثرگذاری بر محتوای قندها و الکل قندها، تحمل گیاه را افزایش می‌دهد (Sharma *et al*.,2019). در آزمایشی بر روی نخود کاربرد اسیدسالیسیلیک باعث افزایش معنی‌دار زیست‌توده در سطوح مختلف تنش خشکی گردید که دلیل آن را اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدسالیسیلیک بر جلوگیری از تخریب سلول‌های گیاهی عنوان نموده‌اند (Farjam & Siosemadrdeh, 2014). در پژوهشی دیگر کاربرد اسیدسالیسیلیک نسبت به تیمار شاهد، باعث افزایش معنی‌دار اجزای عملکرد در نخود گردید (Norouzi *et al*., 2018). اثر مثبت کاربرد اسیدسالیسیلیک بر محتوای کلروفیل و کاروتنوئید ژنوتیپ‌های نخود (Ramezannezhad *et al*., 2013) نیز گزارش شده است.

محتوای نسبی آب برگ (RWC[1]) شاخصی برای سنجش میزان تنش گزارش شده و کاهش آن مربوط به کاهش جذب آب توسط گیاه است. اسیدسالیسیلیک سبب افزایش درصد آب بافت برگ و در نتیجه افزایش RWC در سیاهدانه شد (Fazeli *et al*., 2017). در آزمایشی بیشترین عملکرد نخود تحت تنش شوری با کاربرد توأم اسیدسالیسیلیک و باکتری‌های محرک رشد به‌دست آمد (Riaz *et al*., 2019).

ارقام مختلف گیاهان زراعی از نظر واکنش به تنش‌های محیطی با یکدیگر تفاوت دارند. برای مثال در آزمایشی در تمامی سطوح تنش خشکی، غلظت پرولین به عنوان شاخصی جهت ارزیابی تنش در نخود رقم ILC482 کمتر از رقم کردستان بود (Farjam & Siosemadrdeh, 2014). هدف از اجرای این پژوهش مطالعه اثر اسیدسالیسیلیک و کودهای زیستی بر عملکرد از طریق بهبود فرایندهای فیزیولوژیک در شرایط دیم بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ در مزرعه پژوهشی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه اجرا شد. شهرستان کرمانشاه با ارتفاع ۱۳۱۹ متر از سطح دریای آزاد در طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۹ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۲۱ دقیقه قرار دارد. این منطقه دارای میانگین بارندگی ۴۸۰-۴۵۰ میلی‌متر و جزو مناطق سرد معتدل با دماهای بیشینه و کمینه به ترتیب ۲۲/۶ و ۵/۹ درجه سلسیوس است. در این آزمایش دو رقم بیونیج (رقم محلی و دارای دانه‌های سفیدرنگ و درشت و وزن۱۰۰دانه بالا بازارپسندی مطلوبی نسبت به ارقام مرسوم) و آزاد (رقم اصلاح‌شده، متحمل به بیماری برق‌زدگی، تیپ بوته ایستاده، زودرس‌تر از رقم هاشم و پرمحصول و دانه‌درشت‌تر از رقم هاشم و آرمان)، سه سطح محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک (عدم کاربرد، مصرف نیم و یک میلی‌مولار) و کودهای‌زیستی (در پنج سطح شاهد، باکتری بیوسوپرفسفات (*Pseudomonas*+Enterobacter)، باکتری بیوسولفور (*Thiobacillus* spp.)، باکتری ریزوبیوم (*Mesorhizobium ciceri*) و قارچ میکوریزا (*Rhizophagus irregularis*) با $CFU=10^8$ در آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط دیم اجرا شد. اعمال تیمارهای کودزیستی بر

۱- Relative Water Content

اساس نتایج آنالیز ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی خاک و نیاز گیاه به شرح زیر هنگام کشت بذر انجام شد. باکتری بیوسولفور (*Thiobacillus* spp.) با $CFU=10^8$ به ازای هر میلی‌گرم بود که به میزان شش کیلوگرم در هکتار به همراه ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار گوگرد بنتونیت‌دار ۹۰ درصد و کود دامی پوسیده به روش شیاری در زیر و کنار بذر به‌کار گرفته شد. قارچ میکوریز (*Rhizophagus irregularis*) به میزان ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار و اختلاط با خاک منطقه گسترش ریشه مصرف شد. باکتری ریزوبیوم (*Mesorhizobium ciceri*) خالص‌سازی‌شده در بخش بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب، به روش پاششی[1] با زادمایه باکتری ریزوبیوم به میزان هفت گرم زادمایه که هر گرم آن 10^7 عدد باکتری زنده و فعال است به‌وسیله محلول چسباننده (صمغ عربی)، تلقیح و بلافاصله بعد از خشک شدن سطح بذور، به سرعت اقدام به کشت گردید (Karasu *et al.*, 2009). کود مایع بیوسوپرفسفات (*Pseudomonas+Enterobacter*) تهیه شده از شرکت فن‌آوری زیستی مهرآسیا با $CFU=10^8$ به ازای هر میلی‌لیتر، به روش پاششی روی بذور ارقام نخود پاشیده و بعد از خشک شدن سطح بذور، به کشت آن‌ها اقدام شد (Karasu *et al*., 2009).

در ضمن، به منظور تلقیح، به ازای ۶۰ کیلوگرم بذر مقدار یک لیتر زادمایه استفاده شد. اعمال تیمارهای محلول‌پاشی برگ‌های نخود با اسیدسالیسیلیک، حدود دو هفته قبل از گل‌دهی آغاز (Rajabi *et al*., 2012) و به مدت ۲۰ روز ادامه یافت.

مساحت هر واحد آزمایشی شش متر مربع (چهار متر طول و یک‌ونیم متر عرض) و در هرکرت شش ردیف روی خطوط کاشت ۲۵ سانتی‌متری به فواصل ۱۰ سانتی‌متر از هم و تراکم ۴۰ بوته در متر مربع و به عمق هفت سانتی‌متر در ۲۹اسفندماه کشت شدند (Fetri *et al*., 2016). فاصله بین واحدهای آزمایشی نیم متر و فاصله بین دو تکرار سه‌ونیم متر بود.

زمین آزمایش در پاییز سال ۱۳۹۵ شخم زده شد و قبل از کاشت، دو نمونه مرکب خاک به روش نمونه‌برداری ازاعماق صفر تا ۳۰ و ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متری تهیه و طبق جداول ۱ و ۲ آنالیز شدند و وضعیت هواشناسی محل انجام آزمایش نیز در جدول ۳ نشان داده شده است.

محتوای آب نسبی برگ‌ها (RWC[2]): پس از اعمال تیمار محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و در مرحله به‌غلاف‌رفتن، مقدار ۰/۵گرم از جوان‌ترین برگ توسعه‌یافته هر گیاه (FW) جدا و سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر غوطه‌ور ماند. چهار ساعت بعد از آب‌گیری، قطعات برگ بلافاصله وزن گردید تا وزن در هنگام تورژسانس (TW) به دست آمد. پس از آن قطعات برگ در آون ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شد تا وزن خشک ثابت (DW) به‌دست آمد. درصد RWC از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Cornic, 1994):

رابطه ۱:

$$RWC(\%)= (FW - DW) / (TW - 100\times DW)$$

FW: وزن تازه برگ‌ها بر حسب گرم

DW: وزن خشک برگ‌ها بر حسب گرم

TW: وزن برگ‌ها به هنگام تورژسانس بر حسب گرم

آب نسبی ازدست‌رفته برگ‌ها (RWL[3]): پس از اعمال تیمار محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و در مرحله به‌غلاف‌رفتن، حدود ۰/۵گرم از برگ‌های جوان از بوته‌های هر کرت جدا و بلافاصله با ترازوی دقیق با دقت ۰/۱، وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری گردید. سپس برگ‌ها دردمای ۳۵ درجه سلسیوس به مدت پنج ساعت نگهداری و بلافاصله وزن پژمردگی آن‌ها اندازه‌گیری شد (WW5H). پس از آن برگ‌ها در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به طور کامل خشک و وزن خشک آن‌ها یادداشت گردید. در نهایت میزان آب نسبی ازدست‌رفته برگ از طریق رابطه زیر محاسبه شد (Cornic, 1994):

رابطه ۲:

$$RWL(\%)= (FW - WW5H) / (TW - DW)\times 100$$

FW: وزن تازه برگ‌ها بر حسب گرم

WW5H: وزن پژمردگی برگ‌ها پس از پنج ساعت بر حسب گرم

TW: وزن برگ‌ها به هنگام تورژسانس بر حسب گرم

DW: وزن خشک برگ‌ها

برای تعیین غلظت کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئیدها از روش آرنون و با استفاده از نیم گرم برگ تازه استفاده شد (Arnon, 1967).

۱- Sprinkle application

۲- Relative Water Content

۳- Relative Water Loss

اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن پس از محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک و در مرحله به‌غلاف‌رفتن، شامل قراردادن ۰/۳گرم از بافت برگ با ۱/۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی بر روی یخ همو‌ژنیزه و انتقال به میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور و سانتریفیوژ در دمای چهار درجه سلسیوس و استفاده از عصاره حاصله برای اندازه‌گیری میزان پراکسید هیدروژن در طول موج ۳۹۰ نانومتر بود (Ghiazdowska *et al*., 2010).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز پس از اعمال تیمار محلول پاشی اسیدسالیسیلیک و در مرحله به‌غلاف‌رفتن، مقدار یک میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی با ۳۰۰۰ میکرومول بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=7 و ۱۰۰ میکرومولار آب اکسیژنه مخلوط شد. این محلول برای مدت یک دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس برای توقف فعالیت آنزیم کاتالار، مقدار ۱۰میلی لیتر اسید سولفوریک ۲درصد به مخلوط اضافه شد. آن‌گاه توسط پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۱ مولار تا تشکیل رنگ صورتی کم‌رنگ (حداقل ۳۰ ثانیه با رنگ ثابت) تیتر شد و سپس فعالیت آنزیم کاتالاز بر حسب حجم مصرفی محلول پرمنگنات پتاسیم بر حسب درصد کنترل محاسبه شد (Chance & Maehly, 1955).

برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول بافر استات، آب اکسیژنه و بنزیدین تهیه و درحمام یخ با یکدیگر مخلوط گردید و بلافاصله ۰/۱میلی لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول موج ۵۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد جذب در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین محلول محاسبه گردید (Wenhugsic, 1992).

جدول۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 1. Physical and chemical properties of experimental site soil

عمق Depth (cm)	بافت Texture	درصد رس Clay (%)	درصد سیلت Silt (%)	درصد شن Sand (%)	مواد خنثی‌شونده TNV[1] (%)	هدایت الکتریکی EC (ds/m)	اسیدیته pH
0-30	clay رسی	60	34	6	30	1.1	7.6
30-60	clay رسی	56	35	9	34	1.3	7.6

جدول ۲- خصوصیات شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 2. Chemical properties of soil

عمق خاک (سانتی‌متر) Soil depth (cm)	کربن آلی (درصد) Organic C (%)	نیتروژن کل (درصد) Total N (%)	گوگرد (درصد) S (%)	فسفر (میلی‌گرم بر کیلوگرم) P ($mg.kg^{-1}$)	پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) K ($mg.kg^{-1}$)	منگنز (میلی‌گرم بر کیلوگرم) Mn ($mg.kg^{-1}$)	آهن (میلی‌گرم بر کیلوگرم) Fe ($mg.kg^{-1}$)	روی (میلی‌گرم بر کیلوگرم) Zn ($mg.kg^{-1}$)	مس (میلی‌گرم بر کیلوگرم) Cu ($mg.kg^{-1}$)
0-30	0.9	0.08	0.03	10.4	430	6.8	6.1	0.41	1.04
30-60	0.6	0.06	0.02	8	390	4.6	5	0.14	0.75

۱- Total Neutralizing Value

جدول ۳- میزان بارندگی و میانگین حداقل و حداکثر دما در ماه در طول دوره کاشت تا برداشت
Table 3. Rainfall and max and min temprature during sowing date to harvesting

شاخص‌های هواشناسی Meteorological indices	ماه‌های سال Months of year			
	اسفند March	فروردین April	اردیبهشت May	خرداد June
بارندگی (میلی‌متر) Rainfall (mm)	49.7	134.48	22.45	0
میانگین دمای حداقل Min. temperature (C°)	5.8	6.49	9.51	11.66
میانگین دمای حداکثر Max. temperature (C°)	13.3	17.36	26.61	32.85

برای اندازه‌گیری عملکرد دانه، زمانی که بوته‌ها در رسیدگی کامل هستند (رطوبت دانه ۱۴ درصد)، برداشت بوته‌های موجود در دو ردیف میانی هر کرت انجام (از هر کرت نیم‌متر از پایین و نیم‌متر از بالا به عنوان حاشیه درنظر گرفته شد) و پس از جداکردن ریشه‌های بوته‌ها و خشک‌کردن بوته‌ها تا زمان ثبات وزن خشک در آون در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، دانه‌ها در رطوبت ۱۰ درصد جدا و توسط ترازوی دیجیتالی عملکرد دانه کل بوته‌ها اندازه‌گیری گردید (Salahi Farahi *et al.*, 2016).

آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۳ و مقایسه میانگین ها علاوه بر حالت کلی، از طریق اثرات متقابل سه‌گانه آن‌ها نیز به روش برش‌دهی (اثر متقابل تیمارهای کود زیستی و اسید سالیسیلیک به‌طور جداگانه با ارقام بیونیج و آزاد) با روش LSD صورت گرفت.

نتایج و بحث

اثر اصلی کودهای‌زیستی و اثر متقابل رقم×کودهای‌زیستی بر RWC معنی‌دار شد (جدول ۴). بالاترین RWC در رقم بیونیج و با کاربرد کود میکوریز و کمترین RWC در رقم آزاد و با کاربرد کود بیوسولفور با ۲۷ درصد اختلاف به‌دست آمد (جدول ۵). از سوی دیگر به نظر می‌رسد دو رقم بیونیج و آزاد در واکنش به نوع کودهای‌زیستی تفاوت داشته‌اند. بخشی از اثر متفاوت کودهای زیستی بر ارقام می‌تواند ناشی از اختلاف خصوصیات ژنتیکی و فیزیولوژیکی دو رقم آزاد و بیونیج باشد و بخشی دیگر نیز ناشی از تفاوت در نوع کودهای زیستی است؛ زیرا مکانیسم اثر این دو کودزیستی یکسان نیست. به‌عبارتی میکوریز قارچ است که با هیف‌های خود سطح ریشه را گسترش می‌دهد، اما بیوسولفور باکتری است و وظیفه اکسیدکردن گوگرد را دارد. در آزمایشی بر روی نخود کاربرد کود زیستی، RWC را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد (Akhtar *et al.*, 2017). کاربرد کود ریزوباکتری می‌تواند باعث بهبود هدایت روزنه‌ای، افزایش طول و سطح ریشه و جذب آب از فواصل دورتر گردد که در نهایت منجر به بهبود RWC می‌شود (Amir *et al.*, 2013).

براساس نتایج این مطالعه مشخص شد که آب نسبی ازدست‌رفته برگ‌ها (RWL) به‌طور کلی در سطوح مختلف تیمار کودزیستی در رقم بیونیج بالاتر از رقم آزاد بود، به‌طوری که در رقم بیونیج و عدم کاربرد کودهای‌زیستی بالاترین میزان RWL به مقدار ۴۲/۷۷ درصد حاصل شد. هر چند که در رقم بیونیج کاربرد کودهای‌زیستی مختلف سبب کاهش RWL برگ‌ها شد، ولی نتایج نشان داد که در رقم آزاد فقط کاربرد بیوسولفور سبب کاهش RWL شد، در حالی که کاربرد سایر کودهای زیستی از قبیل بیوسوپرفسفات، ریزوبیوم و میکوریز، RWL رقم آزاد را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. در بین همه تیمارها نیز کمترین RWL در تیمار کاربرد بیوسولفور و در رقم آزاد (۲۷/۲۷ درصد) به‌دست آمد که نسبت به تیمار عدم کاربرد کودهای‌زیستی در رقم بیونیج حدود ۵۷ درصد کاهش را نشان داد (جدول ۵). در آزمایشی در شرایط تنش شدید خشکی از میان چهار رقم نخود آزاد، بیونیج، هاشم و ILC482، بالاترین RWL مربوط به رقم بیونیج و کمترین آن مربوط به ارقام آزاد و ILC482 بود (Mansourifar *et al.*, 2012). به احتمال زیاد اختلاف در واکنش دو رقم آزاد و بیونیج نسبت به کودهای‌زیستی دلیل اصلی متفاوت‌بودن RWL با کاربرد سطوح مختلف کودهای‌زیستی می‌باشد.

در نگـاهی کلـی کـاربرد کودهـای‌زیسـتی باعـث افـزایش معنـی‌دار محتـوای کلروفیـلa، کلروفیـلa/b، کلروفیـل کـل و کاروتنوئیـد نسـبت بـه شـاهد شـد (جـدول ۶). اثـر متقابـل اسیدسالیسـیلیک و کـودزیسـتی بـرای محتـوای کلروفیـل a معنی‌دار شد (جدول ۴). بالاترین کلروفیـل a از کـاربرد غلظـت نیم میلی‌مولار و کود زیستی ریزوبیوم و کمترین کلروفیـل a از عـدم کـاربرد اسـیدسالیسـیلیک و کـودزیسـتی بـه‌دسـت آمـد (جدول۶) که اختلاف ۲/۸۹ برابری میان آن‌ها را نشـان داد. در پژوهشی بر روی نخود کاربرد توأم اسیدسالیسـیلیک و بـاکتری ریزوبیوم یا باعث افزایش کلروفیل‌های a، b و کارتنوئیـدها شـد (Riaz *et al*., 2019). در آزمایشی وقتی گیاه نخود تحت تنش خشکی محیطی قرار گرفت، کلروفیلa ، b و کاروتنوئید به طور معنی‌داری کاهش یافت که با استفاده از اسـیدسالیسـیلیک بـر این کاهش غلبـه شـد، زیـرا اسـیدسالیسـیلیک باعـث افـزایش فعالیت روبیسکو و PEP کربوکسیلاز در شرایط تنش مـی‌شـود (Hayat *et al*., 2012).

اثـرات متقابـل رقـم و اسـیدسالیسـیلیک بـرای محتـوای کلروفیلb معنی‌دار شد (جدول۴). بالاترین کلروفیلb در هر دو رقم بیونیج و آزاد در سطح یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک بـه دست آمد (جدول ۷). کمترین کلروفیـلb در رقـم بیـونیج و بـا عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک مشاهده شدکه با بالاترین محتوای کلروفیـل b مقـدار ۷/۷ درصـد اخـتلاف داشـت (جـدول ۷). همچنین اثرات متقابل رقم و کودهای زیستی بـرای کلروفیـلb معنی‌دار گردید (جدول ۴). بالاترین کلروفیلb در رقم بیونیج و با کاربرد بیوسولفور و کمترین کلروفیلb در رقم آزاد و بـا عـدم کاربرد کـودزیسـتی مشـاهده شـد کـه دارای اختلافـی حـدود ۳۲درصد بودند (جدول ۵).

اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و کودزیستی بـرای کلروفیـل کل معنی‌دار شد (جدول ۴). مقایسه میانگین (جدول ۶) نشـان داد بـــالاترین کلروفیـــل کـــل از کـــاربرد یـــک میلـــی‌مـــولار اسیدسالیسیلیک و ریزوبیوم و کمتـرین کلروفیـل کـل از عـدم کاربرد اسیدسالیسیلیک و کودهـای زیسـتی بـه‌دسـت آمـد. در نگاهی کلی در تمامی سطوح اسیدسالیسیلیک کمترین کلروفیل کل از عدم کاربرد کودزیستی به‌دست آمد. کاربرد تـوأم اسـید-سالیسیلیک و کودزیستی می‌تواند باعث افزایش کلروفیل‌هایa ، b و کلروفیل کل در نخود شود (Riaz *et al*., 2019).

کودهای زیستی می‌توانند به‌طور مستقیم از طریق کمـک کردن به جذب منابع (نیتروژن، فسفر و مواد معدنی ضـروری) و یا با بهینـه‌نمـودن سـطح هورمـون‌هـای گیـاهی و یـا بـه‌طـور غیرمستقیم اثرات عوامل بیماری‌زای مختلف را محدود ساخته و به رشد گیاه کمک نمایند و از این طریق باعث افزایش محتوای کلروفیل برگ شوند (Shweta & Kaur, 2017).

اثر متقابل رقم و اسیدسالیسیلیک بر نسبت کلروفیل a بـه b معنی‌دار گردید (جدول ۴). بالاترین نسبت کلروفیـل a بـه b در هر دو رقم آزاد و بیـونیج بـا کـاربرد اسـیدسالیسـیلیک نـیم میلی‌نرمال و کمترین نسبت کلروفیل a به b در رقم آزاد و عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک مشاهده شد (جدول ۷). همچنـین اثـر متقابل اسیدسالیسیلیک و کودزیستی برای نسـبت کلروفیـل a به b معنی‌دار گردید (جدول ۴). نتایج مقایسه میانگین (جـدول ۶) نشـان داد کـه هماننـد نتـایج کلروفیـل a بـالاترین نسـبت کلروفیل a به b ازکاربرد غلظت نیم میلی‌مـولار و کـود زیسـتی ریزوبیوم و کمترین نسبت کلروفیل a به b از عدم کاربرد اسید-سالیسیلیک و کود زیستی به‌دسـت آمـد (جـدول ۶) کـه ۲/۷۷ برابـر تفـاوت را نشـان داد. محتـوای کلروفیـلa، کلروفیـلa/b، کلروفیل کل و کاروتنوئید با کاربرد کودهای زیستی به ترتیب تا ۱/۸۳، ۱/۲۶۹، ۳/۳۴۷ و ۹/۶۶ میلی‌گرم بر میلـی‌لیتـر افـزایش یافت.

اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و کودزیسـتی بـرای محتـوای کاروتنوئیـد معنـی‌دار گردیـد (جـدول ۴). بیشـترین محتـوای کاروتنوئید با کاربرد غلظت نیم‌میلی‌مولار اسیدسالیسـیلیک بـه همراه بیوسولفور به‌دست آمد که با کمترین محتوای کاروتنوئید بـا عـدم کـاربرد اسـیدسالیسـیلیک و کـودزیسـتی، ۷۲ درصـد اخـتلاف داشـت (جـدول ۶). در آزمـایش‌هـایی کـاربرد تـوأم اسیدسالیسیلیک و کودزیستی بالاترین محتـوای کاروتنوئیـد را در برگ نخود (Riaz *et al*., 2019) و آفتـابگردان (Khan *et al*., 2018) باعث شد. این موضوع را می‌توان به بهبـود شـرایط تغذیه‌ای و رطوبتی در محـیط پیرامـون ربـط داد. در آزمایشـی کاربرد اسیدسالیسیلیک و کودهای‌زیستی باعث انباشت عناصـر درشت و ریزمغذی‌ها در ریزوسفر خـاک و نیـز حفـظ محتـوای رطوبت خاک شد (Khan & Bano, 2019).

اثر متقابل اسیدسالیسـیلیک و کـود زیسـتی بـر محتـوای پراکسید هیدروژن (H_2O_2) معنی‌دار گردید (جـدول ۴). نتـایج مقایسه میانگین (جـدول ۶) نشـان داد کـه بیشـترین محتـوای پراکسید هیدروژن با عـدم کـاربرد اسـیدسالیسـیلیک و کـاربرد میکوریز به‌دست آمد. البته این ترکیب تیمـاری بـا ۱۰ ترکیـب تیمـاری دیگـر تفـاوت معنـی‌داری نداشـت. کمتـرین محتـوای

پراکسید هیدروژن از عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک و کود زیستی حاصل شد. در نگاهی کلی در تمامی سطوح اسیدسالیسیلیک کمترین پراکسید هیدروژن از عدم کاربرد کود زیستی به‌دست آمد (جدول ۶). پراکسید هیدروژن، به عنوان یک گونه اکسیژن واکنش‌پذیر، در بسیاری از سیستم‌های زیستی به‌طور گسترده تولید می‌شود. H_2O_2 یک مولکول مهم در پیام‌رسانی است که واسطه فرایندهای مختلف فیزیولوژیک و بیوشیمیایی در گیاهان می‌باشد. متابولیسم طبیعی سلول‌های گیاهی منجر به تولید H_2O_2 از منابع مختلف می‌شود (Niu & Liao, 2016). در آزمایشی روی یونجه (*Medicago sativa*) کاربرد کودهای زیستی باعث افزایش معنی‌دار H_2O_2، هم در بخش هوایی گیاه و هم در ریشه گردید و میان محتوای H_2O_2 در بخش هوایی با محتوای کاتالاز در بخش هوایی همبستگی مثبت معنی‌دار مشاهده شد. این افزایش به دلیل افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز بوده که در اثر کاربرد کودهای زیستی این اتفاق رخ داده و سبب شده مقدار بیشتری از رادیکال سوپراکسید تولیدشده توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن تبدیل شده که اثر زیانبار کمتری بر سلول دارد. همچنین میان H_2O_2 و مقدار نیتروژن خاک و محتوای مس درون گیاه همبستگی مثبت معنی‌دار مشاهده گردید (Shen *et al*., 2019). امکان دارد افزایش محتوای نیتروژن و عناصر غذایی توسط کودهای زیستی باعث افزایش H_2O_2 در گیاه نخود شده باشد. در آزمایشی غلظت بالای H_2O_2 و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase) در ریشه یونجه تلقیح‌شده با کود زیستی مشاهده شد، سوپراکسید دیسموتاز نقش محوری در تبدیل رادیکال‌های سوپراکسید به H_2O_2 و اکسیژن مولکولی دارد (Shen *et al*., 2019).

براساس این نتایج مشخص شد که کاربرد کودهای زیستی منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو رقم بیونیج و آزاد شد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در ارقام بیونیج و آزاد به مقدار ۰/۰۷۶ نانومول بر دقیقه بر گرم در تیمار عدم کاربرد کودهای‌زیستی حاصل شد و نتایج نشان داد که در رقم بیونیج و آزاد کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به میزان ۰/۰۵۸ و ۰/۰۵۹ نانومول بر دقیقه بر گرم به‌ترتیب با کاربرد بیوسوپرفسفات و بیوسولفور به‌دست آمد (جدول ۵). همچنین مشخص شد که افزایش غلظت محلول‌پاشی اسیدسالیسلیک منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو رقم شد (جدول ۷) و این افزایش به دلیل اثر آنتی‌اکسیدانی اسیدسالیسیلیک در پالایش گونه‌های فعال اکسیژن و کمک به سیستم آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم کاتالاز می‌باشد. به هر حال با توجه به نقش غلظت اسیدسالیسیلیک در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز مشخص شد که در سطوح مختلف کودهای‌زیستی نیز غلظت اسیدسالیسلیک بر فعالیت آنزیم کاتالاز اثر گذاشته و مشاهده شد که در سطح تیمار عدم کاربرد کودهای‌زیستی، افزایش غلظت اسیدسالیسلیک سبب کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شد (جدول ۶). بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار عدم کاربرد کودهای زیستی و اسیدسالیسلیک به میزان ۰/۰۸۱ نانومول بر دقیقه بر گرم بود. بر اساس نتایج مشخص شد که در سطوح مختلف غلظت اسیدسالیسلیک واکنش کودهای زیستی بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز متفاوت بود، به‌طوری که میزان فعالیت این آنزیم در سطوح شاهد، نیم و یک میلی مولار از اسیدسالیسلیک به‌ترتیب با کاربرد کودهای میکوریز (۰/۰۶۱ نانومول بر دقیقه بر گرم)، بیوسوپرفسفات (۰/۰۵۷ نانومول بر دقیقه بر گرم) و بیوسولفور (۰/۰۵۴ نانومول بر دقیقه بر گرم) کمتر از سایر تیمارهای کاربرد کودهای زیستی بود (جدول ۶). در نگاهی کلی با افزایش غلظت اسیدسالیسیلیک میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت، به طوری که کمترین میزان فعالیت این آنزیم در سطح محلول‌پاشی یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک به‌دست آمد.

همچنین اثر متقابل اسیدسالیسیلیک و کودهای زیستی بر فعالیت پراکسیداز معنی‌دار شد (جدول ۴). بیشترین فعالیت پراکسیداز در شرایط عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک و کود زیستی مشاهده گردید (جدول ۶). بالاترین و کمترین فعالیت پراکسیداز به‌ترتیب در شرایط عدم کاربرد اسیدسالیسیلیک×عدم کاربرد کودزیستی به (۰/۰۷۸ نانومول بر دقیقه بر گرم) و اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار×کاربرد ریزوبیوم (۰/۰۴۹نانومول بر دقیقه بر گرم) حاصل شد. غلظت‌های نیم و یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک به همراه ریزوبیوم کمترین میزان فعالیت پراکسیداز را به خود اختصاص دادند. در آزمایشی بر روی نخود نشان داده شد که در شرایط عدم تنش خشکی غلظت نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد به طور معنی‌داری فعالیت پراکسیداز کمتری داشت ولی غلظت یک میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک نسبت به شاهد، تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (Shooryabi & Ganjeali, 2012).

جدول۴- تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیکی برگ تازه و عملکرد دانه نخود تحت تاثیر سطوح مختلف ارقام، اسید سالیسیلیک و کودهای زیستی

Table 4. Analysis of variance for physiological characteristics of fresh leaf and grain yield of chickpea under different levels of salicylic acid and biofertilizers

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	Mean square میانگین مربعات										
		RWC	RWL	aکلروفیل Chl-a	bکلروفیل Chl-b	کلروفیل کل Chl-ab	a/bکلروفیل Rate of Chl a/b	کاروتنوئید Carotenoid	پراکسید هیدروژن Hydrogen peroxide	کاتالاز catalase	پراکیسداز peroxidase	عملکرد دانه Grain yield
Block بلوک	2	71.4^{ns}	163*	009^{ns}	0.001^{ns}	0.009^{ns}	0.006^{ns}	2.11*	0.37^{ns}	0.00001^{ns}	0.000004^{ns}	12872^{ns}
Cultivar رقم	1	6.20^{ns}	401**	0.005^{ns}	0.001^{ns}	0.01^{ns}	0.0007^{ns}	0.05^{ns}	0.89^{ns}	0.00001^{ns}	0.00001^{ns}	168050**
اسید سالیسیلیک Salicylic acid	2	100^{ns}	231**	3.47**	0.07**	4.02**	1.44**	0.53^{ns}	5.17**	0.0004**	0.0004**	286540**
Biofertilizer کود زیستی	4	166**	63.9^{ns}	0.88**	0.01**	1.10**	0.33**	28.2**	18.5**	0.0008**	0.0008**	280884**
رقم × اسید سالیسیلیک salicylic acid× Cultivar	2	86^{ns}	31.3^{ns}	0.03^{ns}	0.004**	0.02^{ns}	0.02*	0.76^{ns}	1.51^{ns}	0.00003*	0.000005^{ns}	22114**
رقم × کودهای زیستی Biofertilizer×Cultivar	4	122*	170**	0.005^{ns}	0.005*	0.01^{ns}	0.002^{ns}	0.38^{ns}	1.27^{ns}	0.00005**	0.00004*	10006^{ns}
اسید سالیسیلیک × کود زیستی Biofertilizer×Salicylic acid	8	56.4^{ns}	65.1^{ns}	0.12**	0.003^{ns}	0.1**	0.07**	5.22**	3.42**	0.00009**	0.00007**	23481**
رقم × اسید سالیسیلیک × کود زیستی salicylic acid× Biofertilizer ×Cultivar	8	60.1^{ns}	102*	0.009^{ns}	0.001^{ns}	0.006^{ns}	0.009^{ns}	0.93^{ns}	0.34^{ns}	0.00002*	0.00001^{ns}	14873*
خطای آزمایش Error	58	38.1	64.4	0.01	0.002	0.01	0.01	0.7	0.83	0.00001	0.00001	7291
ضریب تغییرات (درصد) CV (%)		11	19.7	9.11	3.04	4.70	9.98	9.99	8.22	5.01	6.82	6.17

* و** به تر تیب وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال خطای پنج و یک درصد، ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

* and ** represent of significant difference in 5 and 1 % , ns indicate of non-significant difference

در نگاهی کلی در هر سه سطح اسیدسالیسیلیک بالاترین فعالیت پراکسیداز در شرایط عدم کاربرد کود زیستی مشاهده گردید. این احتمال وجود دارد که کودهای زیستی از شرایط تنش‌زای درون خاک به‌ویژه تنش‌های تغذیه‌ای و رطوبتی کاسته و در این راستا از فعالیت پراکسیداز کاسته شده است. پراکسیداز در مقاومت در برابر تنش‌های دمایی، pH، شوری، فلزات سنگین و حلال‌های آلی و غیره نقش دارد (Pandey *et al.*, 2017). کاربرد کودهای زیستی با تأمین مداوم نیتروژن و فسفر در طی رشد و با تأمین متعادل عناصر غذایی مورد نیاز گیاه می‌توانند میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را کاهش دهند (Amani *et al.*, 2017).

با توجه به نتایج این مطالعه مشخص شد که در هر دو رقم بیونیج و آزاد، بالاترین میزان عملکرد دانه در غلظت نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک به‌دست آمد و در غلظت‌های کمتر و بیشتر و به‌ویژه در تیمار کاربرد اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار کمترین میزان عملکرد دانه به‌دست آمد. بیشترین و کمترین میزان عملکرد دانه به‌میزان ۱۶۲۶ و ۱۱۸۰ کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب در غلظت‌های نیم و یک میلی‌مولار و در ارقام بیونیج و آزاد حاصل شد (جدول ۷). نتایج همچنین نشان داد که در سطوح مختلف کاربرد کودهای زیستی نیز بالاترین میزان عملکرد دانه در همه سطوح کودهای زیستی در تیمار کاربرد نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک به‌دست آمد و کمترین میزان عملکرد دانه نیز در همه سطوح کودهای‌زیستی در سطح کاربرد اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار حاصل شد.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر ارقام نخود و کودهای زیستی بر محتوای نسبی آب برگ، آب نسبی ازدست‌رفته برگ‌ها، غلظت کلروفیل b، کاتالاز و پراکسیداز در شرایط دیم

Table 5. Mean comparison effect of cultivar and biofertilizers on studied of RWC, RWL, Chl-b, catalase and Peroxidase of chickpea under dryland condition Peroxidase

رقم Cultivar	کود زیستی Bio fertilizer	محتوای نسبی آب برگ (درصد) RWC (%)	آب نسبی ازدست‌رفته برگ‌ها (درصد) RWL (%)	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم ماده تر) Chl-b (mg/g)	کاتالاز (نانومول بر دقیقه بر گرم) Catalase (nmol/min/g)	پراکسیداز (نانومول بردقیقه بر گرم) Peroxidase (nm/min/g)
بیونیج Bivanij	Control عدم کاربرد	55.41[bc]	42.77[a]	1.433[de]	0.076[a]	0.067[b]
	Biosuperphosphate بیوسوپرفسفات	56.60[abc]	36.63[ab]	1.431[e]	0.066[b]	0.063[c]
	BioSulphur بیوسولفور	54.36[bcd]	36.10[b]	1.532[a]	0.058[d]	0.058[e]
	Rhizobium ریزوبیوم	51.50[cd]	34.85[b]	1.469[b-e]	0.061[c]	0.053[fg]
	Mycorrhiza میکوریز	62.12[a]	32.31[bc]	1.474[bcd]	0.062[c]	0.056[ef]
آزاد Azad	Control عدم کاربرد	57.65[ab]	31.15[bc]	1.428[e]	0.076[a]	0.072[a]
	Biosuperphosphate بیوسوپرفسفات	59.52[ab]	32.68[bc]	1.483[bc]	0.059[cd]	0.062[cd]
	BioSulphur بیوسولفور	48.69[d]	27.27[c]	1.501[ab]	0.060[cd]	0.059[de]
	Rhizobium ریزوبیوم	56.02[bc]	34.65[b]	1.506[ab]	0.062[c]	0.049[g]
	Mycorrhiza میکوریز	48.55[bc]	35.80[b]	1.463[cde]	0.062[c]	0.058[e]

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

Same letters in each column indicate of non-significant difference in 5% level.

جدول ۶ – مقایسه میانگین اثر اسید سالیسیلیک و کودهای‌زیستی بر غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل کل، غلظت کلروفیل a/b غلظت کاروتنوئید، پراکسید هیدروژن، کاتالاز، پراکسیداز و عملکرد دانه در شرایط دیم

Table 6. Mean comparison for effect of salicylic acid and biofertilizers on studied Chl- a, Chl-ab, Chl a/b, Carotenoid, Hydrogen peroxide, Catalase Peroxidase and Grain yield of chickpea under dryland condition

اسید سالیسیلیک Salicylic acid	کودزیستی Bio fertilizer	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم ماده تر) Chl- a (mg/g)	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم ماده تر) Chl-ab (mg/g)	کلروفیل a/b Chl a/b	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم ماده تر) Carotenoid (mg/g)	پراکسید هیدروژن (میلی گرم بر گرم) Hydrogen peroxide (nmol/g)	کاتالاز (نانومول بر دقیقه بر گرم) Catalase (nmol/min/g)	پراکسیداز Peroxidase (nmol/min/g)	عملکرد دانه (کیلوگرم بر هکتار) Grain yield (kg/ha)
عدم کاربرد Control	Control عدم کاربرد	0.47^{e}	1.909^{e}	0.336^{f}	5.61^{e}	7.45^{e}	0.081^{a}	0.078^{a}	1213^{f}
	Biosuperphosphate بیوسوپرفسفات	1.06^{d}	2.473^{d}	0.754^{e}	8.63^{b}	10.70^{bcd}	0.071^{b}	0.066^{b}	1345de
	BioSulphur بیوسولفور	1.26^{c}	2.777^{c}	0.839^{e}	9.6^{ab}	11.20^{abc}	0.064^{cd}	0.059^{cd}	1323de
	Rhizobium ریزوبیوم	1.38^{bc}	2.838^{c}	0.96^{d}	8.95^{ab}	11.82^{a}	0.065^{c}	0.054^{ef}	1599^{a}
	Mycorrhiza میکوریز	1.38^{bc}	2.803^{c}	0.977^{d}	9.25^{ab}	11.97^{a}	0.061^{c-f}	0.064^{bc}	1446^{bc}
نیم میلی‌مولار 0.5mM	Control عدم کاربرد	1.45^{b}	2.839^{c}	1.052^{cd}	5.73^{de}	10.04^{d}	0.078^{a}	0.066^{b}	1385^{cd}
	Biosuperphosphate بیوسوپرفسفات	1.75^{a}	3.191^{ab}	1.227^{ab}	9.41^{ab}	11.71^{ab}	0.057^{gh}	0.057^{def}	1401^{cd}
	BioSulphur بیوسولفور	1.80^{a}	3.294^{ab}	1.207^{ab}	9.66^{a}	11.42^{abc}	0.060^{efg}	0.059^{de}	1448^{bc}
	Rhizobium ریزوبیوم	1.83^{a}	3.281^{ab}	1.269^{a}	8.95^{ab}	11.77^{a}	0.058^{fg}	0.049^{g}	1626^{a}
	Mycorrhiza میکوریز	1.71^{a}	3.165^{b}	1.18^{ab}	9.00^{ab}	11.31^{abc}	0.064^{cd}	0.056^{def}	1532^{ab}
یک میلی‌مولار 1mM	Control عدم کاربرد	1.44^{b}	2.92^{c}	0.975^{d}	7.60^{c}	10.42^{cd}	0.069^{b}	0.066^{b}	1034^{g}
	Biosuperphosphate بیوسوپرفسفات	1.72^{a}	3.255^{ab}	1.113^{bc}	6.61^{d}	11.68^{ab}	0.060^{d-g}	0.065^{b}	1345de
	BioSulphur بیوسولفور	1.74^{a}	3.294^{ab}	1.13^{bc}	8.9^{ab}	11.64^{ab}	0.054^{h}	0.056^{def}	1308^{def}
	Rhizobium ریزوبیوم	1.78^{a}	3.347^{a}	1.141^{bc}	9.31^{ab}	11.5^{ab}	0.062^{cde}	0.049^{g}	1446^{bc}
	Mycorrhiza میکوریز	1.78^{a}	3.326^{ab}	1.164^{abc}	9.00^{ab}	11.82^{a}	0.061^{def}	0.052^{fg}	1282^{ef}

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

Same letters in each column indicate of non-significant difference in 5% level

جدول ۷- مقایسه میانگین اثر ارقام نخود و اسیدسالیسیلیک بر صفات کلروفیلb ، کلروفیل a/b ، کاتالاز و عملکرد دانه در شرایط دیم

Table 7. Mean comparison for effect of cultivar and salicylic acid on studied Chl-b, Chl a/b, Catalase and Grain yield of chickpea under dryland condition

رقم Cultivar	اسید سالیسیلیک Salicylic acid	کلروفیلb (میلی گرم بر میلی لیتر) Chl b (mg/ml)	کلروفیل a/b Chl a/b	کاتالاز (نانومول بر دقیقه بر گرم) Catalase (nmol/min/g)	عملکرد دانه (کیلوگرم بر هکتار) Grain yield (kg/ha)
بیونیج Bivanij	عدم کاربرد control	1.42^{c}	0.805^{c}	0.069^{a}	1539^{b}
	نیم میلی‌مولار 0.5mM	1.44^{bc}	1.171^{a}	0.063^{b}	1626^{a}
	یک میلی‌مولار 1mM	1.52^{a}	1.084^{b}	0.063^{b}	1387^{c}
آزاد Azad	عدم کاربرد control	1.46^{b}	0.741^{c}	0.068^{a}	1232^{d}
	نیم میلی‌مولار 0.5mM	1.43^{bc}	1.203^{a}	0.064^{b}	1332^{c}
	یک میلی‌مولار 1mM	1.53^{a}	1.133^{ab}	0.059^{c}	1180^{d}

وجود حروف مشابه در هر ستون به منزله عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

Same letters in each column indicate of non-significant difference in 5% level.

بر این اساس مشخص شد که بالاترین میزان عملکرد دانه به‌میزان ۱۶۲۶ کیلوگرم در هکتار در تیمار کاربرد ریزوبیوم و در سطح محلول‌پاشی نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک بود، در حالی که کمترین میزان عملکرد دانه به‌میزان ۱۰۳۴ کیلوگرم مربوط به تیمار عدم کاربرد کودهای‌زیستی و محلول‌پاشی اسیدسالیسیلیک یک میلی‌مولار بود (جدول ۶). این موضوع نشان‌دهنده نقش مؤثر کود زیستی ریزوبیوم و محلول‌پاشی نیم میلی‌مولار اسیدسالیسیلیک در افزایش عملکرد بود.

نتیجه‌گیری

در نتیجه این مطالعه مشخص شد که کاربرد اسیدسالیسیلیک با بهبود خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه نخود و همچنین با خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود سبب افزایش عملکرد نخود شده است. همچنین کودهای زیستی اثر بر جذب بیشتر عناصر بر عملکرد دانه اثر مثبت دارند. در نگاه کلی از میان ارقام مورد آزمایش رقم محلی بیونیج، از میان سطوح اسیدسالیسیلیک غلظت نیم میلی‌مولار و از میان سطوح کودهای زیستی کود ریزوبیوم، از لحاظ عملکرد دانه و صفات فیزیولوژیک مؤثر بر عملکرد برتری داشتند.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان و دانشگاه رازی کرمانشاه به جهت کمک در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Amani, N., Sohrabi, Y., and Heidari, G. 2017. Yield and some physiological characteristics in maize by application of bio and chemical fertilizers under drought levels. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 27(2): 65-83. (In Persian with English Summary).
2. Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants: Agronomy Journal 23: 112-121.
3. Akhtar, M., Jamil, M., Ahamd, M., and Abbasi, G. 2017. Evaluation of biofertilizer in combination with organic amendments and rock phosphate enriched compost for improving productivity of chickpea and maiz. Soil and Environment 36(01): 59-69.
4. Amir, M., Aslam, A., Khan, M.Y., Jamshaid, M.U., Ahmad, M., Asghar, H.N., and Zahir, Z.A. 2013. Co-inoculation with Rhizobium and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for inducing salinity tolerance in mung bean under field conditions of semiarid climate. Asian Journal of Agriculture and Biology 1(1): 17-22.

5. Beres, B.L., McKenzie, R.H., Cárcamo, H.A., Dosdall, L.M., Evenden, M.L., Yang, R.C., and Spaner, D.M. 2012. Influence of seeding rate, nitrogen management and micronutrient blend applications on pith expression in solid-stemmed spring wheat. Crop Science 52: 1316-1329.
6. Bhutali, R.V., and Lal, E.P. 2017. Ameliorative effect of salicylic acid on yield, biochemical and antioxidant parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 6(8): 1388-1399.
7. Chance, B., and Maehly, A. C. 1955. Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology 2: 764-775.
8. Cornic, G. 1994. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. In: N.R. Baker and J.R. Bowyer (Eds.). Photoinhibition of Photosynthesis from Molecular Mechanisms to the field. pp. 297-313.
9. Dahal B.R., and Bhandari S. 2019. Biofertilizer: A next generation fertilizer for sustainable rice production. International Journal of Graduate Research and Review 5(1): 1-5
10. Elhakem, A.H. 2019. Impact of salicylic acid application on growth, photosynthetic pigments and organic osmolytes response in *Mentha arvensis* under drought stress. Journal of Biological Sciences 19: 372-380.
11. Farjam S., and Siosemadrdeh, A. 2014. Response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to exogenous salicylic acid and ascorbic acid under vegetative and reproductive drought stress conditions. Journal of Applied Botany and Food Quality 87: 80-86.
12. Fazeli, A., Zarei, B., and Tahmasebi, Z. 2017. The effect of salinity stress and salicylic acid on some physiological and biochemical traits of Black cumin (*Nigella sativa* L.). Iranian Journal of Plant Biology 9(4): 69-84. (In Persian with English Summary).
13. Fetri, M., Ghobadi, M.E., Ghobadi, M., and Mohammadi, G. 2016. Effect of sowing depth and mulching types on soil water storage at different growth stages of chickpea under rain fed farming. Iranian Journal of Pulses Research 7(1): 135-144.
14. Ghiazdowska, A., Krasuska, U., and Bogatek, R. 2010. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. Planta 232: 1397-1407.
15. Hayat, Q., Hayat, S., Alyemeni, M.N., and Ahmad, A. 2012. Salicylic acid mediated changes in growth, photosynthesis, nitrogen metabolism and antioxidant defense system in *Cicer arietinum* L. Plant, Soil and Environment 58(9): 417-423.
16. Jesfar, A.B.M., Rifky, A.L.M., and Rinos, M.H.M. 2018. Study on the feasibility of chickpea cultivation in Ampara area in Sri Lanka. International Journal of Academic and Applied Research 2: 1-4.
17. Karasu, A., Öz, M., and Dogan, R. 2009. The effect of bacterial inoculation and different nitrogen doses on yield and yield components of some chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.). African Journal of Biotechnology 8(1): 59-64.
18. Khan, N., and Bano, A. 2019. Exopolysaccharide producing rhizobacteria and their impact on growth and drought tolerance of wheat grown under rainfed conditions. Plos One 14(9): e0222302. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222302
19. Khan, N., Zandi, P., Ali, S., Mehmood, A., Adnan Shahid, M., and Yang, J. 2018. Impact of salicylic acid and PGPR on the drought tolerance and phytoremediation potential of *Helianthus annus* .Frontiers in Microbiology 9: 2507. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02507
20. Mansourifar, S., Shaban, M., Ghobadi, M., and Sabaghpoor, S.H. 2012. Physiological characteristics of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress and nitrogen fertilizer as starter. Iranian Journal of Pulses Research 3(1): 53-66. (In Persian with English Summary).
21. Niu, L., and Liao, W. 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. Frontiers in Plant Science 7: 230. doi:10.3389/fpls.2016.00230
22. Norouzi, M., Sajedi, N.A., and Gomarian, M. 2018. Effects of salicylic acid and selenium at growth stages on yield and yield components of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under dryland farming condition. Environmental Stresses in Crop Sciences 11(3): 579-589. (In Persian with English Summary).
23. Pandey, V.P., Awasthi, M, Singh, S., Tiwari, S., and Dwivedi, U.N. 2017. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. Biochemistry and Analytical Biochemistry 6(1): 1000308. doi:10.4172/2161-1009.1000308
24. Rajabi, L., Sajadi, N.A., and Roshandel, M. 2012. Intraction of salicylic acid and superabsorbent on agronomocal characteristic and protein percentage chickpea cultivar Hashem in condition of dryland. Crop Production in Environmental Stress 4(1): 37-48. (In Persian with English Summary).

25. Ramezannezhad, R., Lahouti, M., and Ganjali, A. 2013. Effect of salicylic acid on physiological and biochemical parameters on resistant and sensitive chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes under drought stress. Journal of Plant Ecophysiology 5(12): 24-36. (In Persian with English Summary).
26. Riaz, A., Rafique, M., Aftab, M., Qureshi, M.A., Javed, H., Mujeeb, F., and Akhtar, S. 2019. Mitigation of salinity in chickpea by Plant Growth Promoting Rhizobacteria and salicylic acid. Eurasian Journal of Soil Science 8(3): 221-228.
27. Salahi Farahi, M., Dadashi, M.R., and Ajam Norouzi, H. 2016. Effects of planting date, row spacing and Zn and nitrogen fertilizers on rain feed chickpea in Gonbad. Journal of Plant Ecophysiology 9(32): 26-36.
28. Sharma, A., Shahzad, B., Kumar, V., Kohli, S.K., Sidhu, G.P.S., Bali, A.S., Handa, N., Kapoor, D., Bhardwaj, R., and Zheng, B. 2019. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. Biomolecules 9: 285. doi:10.3390/biom9070285
29. Shen, G., Ju, W., Liu, Y., Guo, X., Zhao, W., and Fang, L. 2019. Impact of urea addition and Rhizobium inoculation on plant resistance in metal contaminated soil. International Journal of Environmental Research and Public Health 16(11): 1-17.
30. Shooryabi, M., and Ganjeali, A. 2012. Investigating the effect of salicylic asid on enzymes activity and antioxidant compounds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under drought stress. Environmental Stress in Crop Sciences 5(1): 41-54. (In Persian with English Summary).
31. Shweta, S., and Kaur, M. 2017. Plant hormones synthesized by microorganisms and their role in biofertilizer- A review article. International Journal of Advanced Research 5(12): 1753-1763.
32. Wenhugsic, E.R.B. 1992. Structure biosanteetic of peroxidase from peinot cells, plant peroxidasses.X.U, analysis of osmotic adjustment in crop plants. Journal of Experimental Botany 50: 291-302.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 12, No. 2, December 2021, p. 136-150 (Original Research Article)

Effect of salicylic acid spraying and application of biofertilizers on the physiological characteristics and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under rainfed conditions

Momeni[1], Fardin; Abdali Mashhadi[2*], Alireza; Siadat[3], Seyeed Ataolah; Pakdaman Sardrood[4], Babak; and Mokhtar Ghobadi[5]

1. PhD Student in Agronomy, Department of Plant Production and Genetics, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mollasani, Iran; f_moemeni@yahoo.com
2. Associate Professor of Agronomy, Department of Plant Production and Genetics, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mollasani, Iran
3. Professor of Agronomy, Department of Plant Production and Genetics, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mollasani, Iran; seyedatasiadat@yahoo.com
4. Assistant Professor of Phytopathology, Plant Pathology Department, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Mollasani, Iran; bpakdaman@asnrukh.ac.ir
5. Associate Professor of Crop Physiology, Department of Plant Production and Genetics, Razi University, Kermanshah, Iran; ghobadi.m@razi.ac.ir

Received: 30 May 2020; **Revised:** 26 September 2020
Accepted: 24 February 2021; **Available Online:** 22 December 2021

DOI: 10.22067/ijpr.v12i2.87109

How to cite this article:
Momeni, F., Abdali Mashhadi, A., Siadat, S.A., Pakdaman Sardrood, B., and Ghobadi, M. 2021. Effect of salicylic acid spraying and application of biofertilizers on the physiological characteristics and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under rainfed conditions. Iranian Journal of Pulses Research 12(2): 136-150.

Introduction

Chickpea is one of the valuable pulses and rich source of protein. In most years, in west of Iran, the amount of rainfall is low and the distribution of rainfall is not suitable. In many cases, rainfed lands are affected by drought stress. On the other hand, most rainfed lands have low fertility, especially in nitrogen and phosphorus nutrients. In higher plants, salicylic acid applied to reduce the dangerous effects of drought stress. Different varieties of chickpeas show different responses to environmental changes. This experiment was carried out in order to investigate the effect of salicylic acid and biofertilizers on the physiological characteristics of two chickpea cultivars.

Materials and Methods

This experiment was done in factorial based on randomized complete block design with three replications in Kermanshah under rainfed conditions in the 2016. Kermanshah is located at an altitude of 1319 m of sea level (Latitude: 34°21′ N and Longitude: 47°9′ E). Experimental treatments included two chickpea cultivars (Bivanij and Azad), foliar spraying of salicylic acid (non-application, 0.5 and 1 mill molar concentrations) and biological fertilizer (non-application of biofertilizers, bio-superphosphate bacteria (*Pseudomonas+Enterobacter*), biosulfur bacteria (*Thiobacillus* spp.), a rhizobium bacterium (*Mesorhizobium ciceri*), and mycorrhiza fungus (*Rhizophagus irregularis*). Each plot was six m^2 (four

*** Corresponding Author:** alirezaabdali@ramin.ac.ir

meters long and 1.5 meters wide) with 6 lines (density= 40 plants per m^2, sowing line spacing= 25 cm, sowing distance on each line= 10 cm and sowing depth= 7 cm). The sowing date was March 19. The studied traits were relative water content, relative water loss, chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, chlorophyll a/b ratio, carotenoids, hydrogen peroxide, catalase and peroxidase enzyme activity and grain yield.

Results and Discussion

Foliar spraying of salicylic acid and the application of biofertilizers increased the production of hydrogen peroxide and decreased the activity of catalase and peroxidase enzymes. The highest catalase activity were obtained in Bivanij cultivar×non-application of salicylic acid, Bivanij cultivar×non-use of biofertilizer, non-application of salicylic acid and the lowest catalase activity were obtained in Azad cultivar×one mM salicylic acid, Bivanij cultivar×bio-superphosphate and one mM salicylic acid×biosulfur application. The highest and lowest peroxidase activity were obtained under non-application of salicylic acid×non-application of biofertilizer and one mM salicylic acid×rhizobium application, respectively. The highest relative water loss (RWL) was obtained in Bivanij cultivar×non-application of biofertilizer, while the lowest RWL was observed in Azad cultivar×biosulfur application biofertilizer. Relatively, the content of chlorophyll a, chlorophyll a/b, total chlorophyll and carotenoids increased with the application of biofertilizers. Bivanij cultivar had a higher grain yield than Azad cultivar. In both Bivanij and Azad varieties, the highest grain yield was obtained from the use of rhizobium and mycorrhiza biofertilizers. The highest grain yield (1626 $kg.ha^{-1}$) was observed from the application of the concentration of 0.5 mM of salicylic acid and rhizobium biofertilizer. In both Bivanij and Azad varieties, the highest catalase activity was observed due to non-use of salicylic acid and non-application of biofertilizer.

Conclusion

In general, at all three levels of salicylic acid, the highest peroxidase activity was observed in the absence of biofertilizer application. It is possible that biofertilizers reduce both nutrient deficiencies and drought stress, thus reducing peroxidase activity. In general, in this experiment, in terms of grain yield and physiological traits affecting grain yield, between the cultivars, native Bivanij cultivar, among the salicylic acid levels, the concentration of 0.5 mmol and among the biofertilizers, rhizobium biofertilizer were superior treatments.

Keywords: Antioxidant، Carotenoids، Catalase، Chlorophyll، Hydrogen peroxide